

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19.07.00

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 12 SEP 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 7月19日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第235910号

出 願 人

Applicant (s):

科学技術振興事業団

JP00/04862

E N

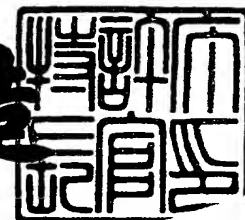
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月25日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特200

【書類名】 特許願

【整理番号】 YOS-2

【提出日】 平成11年 7月19日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 東京都八王子市南陽台 2 - 1 8 - 1 2

【氏名】 山田 晃世

【発明者】

【住所又は居所】 東京都東久留米市大門町 2 - 3 - 6 - 3 0 2

【氏名】 小関 良宏

【発明者】

【住所又は居所】 東京都杉並区和田 2 - 2 1 - 3 9

【氏名】 齋藤 丈夫

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都八王子市南陽台 2 - 1 8 - 1 2

【氏名又は名称】 山田 晃世

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都東久留米市大門町 2 - 3 - 6 - 3 0 2

【氏名又は名称】 小関 良宏

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 環境ストレス耐性遺伝子の単離方法、並びに該方法により単離される遺伝子およびその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 塩ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードする DNA を単離する方法であって、

(a) cDNA ライブラリーが導入された形質転換大腸菌を、形質転換前であれば実質的に生育できない塩条件下で培養し、培養後に生育しているクローンを選択する工程、および

(b) 工程 (a) で選択されたクローンから cDNA を単離する工程、を含む方法。

【請求項 2】 cDNA ライブラリーが導入される大腸菌が 750 mM 以上の塩化ナトリウムを含む培地でコロニー形成が抑制されるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 大腸菌が SOLR 株である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 工程 (a) において 350 mM 以上の塩化ナトリウムを含む培地中で大腸菌の培養を行なう、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 請求項 1 から 4 のいずれかの方法により単離しうる、塩ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 6】 コードするタンパク質が、さらに、熱、凍結、浸透圧、乾燥、紫外線からなる群より選択されるストレスに対する耐性を向上させる活性を有する、請求項 5 に記載の DNA。

【請求項 7】 植物由来である、請求項 5 または 6 に記載の DNA。

【請求項 8】 マングローブ由来である、請求項 7 に記載の DNA。

【請求項 9】 配列番号：1 から 7 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる、または該アミノ酸配列を含むタンパク質をコードする DNA。

【請求項 10】 配列番号：1 から 7 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、植物の塩ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク

質をコードするDNA。

【請求項 1 1】 配列番号：8 から 1 4 のいずれかに記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、植物の塩ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 1 2】 配列番号：1 から 7 のいずれかに記載のアミノ酸配列と 7 0 % 以上のアミノ酸配列の相同性を有するタンパク質がコードするDNAであって、植物の塩ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 1 3】 植物の塩ストレス耐性を向上させるために用いる、請求項 7 から 1 2 のいずれかに記載のDNA。

【請求項 1 4】 請求項 5 から 1 2 のいずれかに記載のDNAを含むベクター。

【請求項 1 5】 請求項 1 4 のベクターが導入された形質転換細胞。

【請求項 1 6】 請求項 5 から 1 2 のいずれかに記載のDNAによりコードされるタンパク質。

【請求項 1 7】 請求項 1 5 に記載の形質転換細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から組換えタンパク質を回収する工程を含む、請求項 1 6 に記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 1 8】 請求項 1 4 に記載のベクターが導入された形質転換植物細胞。

【請求項 1 9】 請求項 1 8 に記載の形質転換植物細胞を含むトランスジェニック植物体。

【請求項 2 0】 請求項 1 9 に記載のトランスジェニック植物体の繁殖材料。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、塩ストレス耐性の向上に関与する遺伝子を単離する方法、該方法により単離される遺伝子、並びに該遺伝子の利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

自然界に存在する生物は塩ストレス、熱ストレス、乾燥ストレス等の種々の環境ストレスにさらされている。特に、塩ストレスは多くの高等植物の生育を阻害する大きな要因の1つである。高等植物の耐塩性強化は、農産物生産の増大につながるため、遺伝子導入により高等植物の耐塩性を強化させる試みが、近年、活発に進められている。

【0003】

例えば、H. J. Bohnertらは大腸菌由来のマニトール合成酵素をタバコに導入することで、タバコの耐塩性が強化された事を報告している (Science Vol. 259, No. 22, p508-510 (1993))。このような高等植物の耐塩性強化はプロリン合成系酵素 (Plant Physiology Vol. 108, p1387-1394 (1995)) やグリシンベタイン合成系酵素を導入することでも同様な効果が得られることが示されている (Plant J Vol. 12, p133-142 (1997), Plant Molecular Biology Vol. 38, 1011-1019 (1998))。

しかしながら、これらの酵素をコードする遺伝子の導入で得られる組み換え植物は、海水程度の塩水に十分適応できるものではない。塩濃度の高い環境で安定に生育できる組み換え植物を作出するためには、既知の耐塩性関連遺伝子とは異なる、全く新しい「耐塩性に関与する遺伝子」の探索が必要である。そしてその探索には塩濃度の高い環境で生育できる植物(塩生植物)由来の遺伝子ライブラリーが適当であると思われる。また、ここで得られる遺伝子は塩ストレスのみならず、その他の環境ストレス(熱、凍結、浸透圧、乾燥、紫外線)の全て、あるいはそのこれらのうちのいくつかのストレスに対する耐性を向上させる活性を有する可能性が期待できる。

一方、沿岸及び河口近くの高濃度の塩分を含む土壤に生息する樹木類にマングローブ植物がある。マングローブ植物は進化の過程で特殊な耐塩性機構を獲得したものと考えられる。このことから、マングローブの耐塩性に関わる遺伝子群を単離できれば、高等植物の耐塩性の強化への応用が期待できる。しかしながら、

マングローブ植物の耐塩性機構を遺伝子レベルで解析した例はこれまでに全くない。その理由はこのような樹木類から直接 mRNA を抽出することが極めて困難であったためと思われる。

【0004】

近年、Mimura らがマングローブ植物の一種である *Bruguiera sexangula* の培養細胞系を確立した (J Res Vol. 110, p 25-29 (1997))。この培養細胞は懸濁培養が可能であり、また 150 mM 以上の塩存在下でも安定に生育することができるといった、他の植物培養細胞とは異なる極めて珍しい性質を有している (J Plant Res Vol. 110, p 31-36 (1997))。この培養細胞を利用すれば、容易にマングローブ植物の cDNA ライブラリーを構築することが可能となり、マングローブ植物の耐塩性に関わる遺伝子群の探索に利用できると考えられる。しかしながら、このような検討はこれまで全く進められていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、各種生物の環境ストレスに対する耐性を強化する効果を有する遺伝子およびその利用を提供することにある。

【0006】

より詳しくは、本発明は、塩ストレス耐性の向上に関与する遺伝子を機能的にスクリーニングする方法を提供する。また、本発明は、該方法により単離される遺伝子、特にマングローブ由来の耐塩性に関与する遺伝子を提供する。さらに、本発明は、これら耐塩性に関与する遺伝子の利用、特に耐塩性が増強されたトランスジェニック植物の作出のための利用を提供する。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するため、本発明者らは塩生植物の一種であるマングローブに着目した。既に培養細胞系が確立されている *Bruguiera sexangula* の培養細胞の分与を得て、これを 100 mM の NaCl 存在下で培養した。ここから抽出した mRNA を基に cDNA ライブラリーを作製し、この中か

らマングローブの耐塩性に関与する遺伝子の探索を試みた。

【0008】

通常、耐塩性関連遺伝子をスクリーニングする方法としては、ディファレンシャルスクリーニング法が広く利用されている（特開平 1 0 - 2 9 5 3 8 0 号公報、塩ストレスにより誘導される新規チオニン遺伝子）。しかし、この方法で単離される遺伝子は、ストレス条件下で特異的に誘導される遺伝子ではあるが、その遺伝子を他の細胞で発現させることでその細胞のストレス耐性を強化できるとは限らない。そこで、本発明者らはストレス耐性に関与する遺伝子の探索に大腸菌の遺伝子発現系を利用する方法を開発した。

この方法で単離したマングローブ由来の遺伝子（cDNA）群はそれぞれ大腸菌の耐塩性を強化する機能を有することが確認された。植物遺伝子を異種生物である大腸菌で発現させて、該大腸菌の耐塩性を向上させることができたため、これらの遺伝子群は、原核生物から真核生物にいたる幅広い生物群で、耐塩性を強化する機能を有するものと考えられた。実際、本発明者等は、単離した mang 1 遺伝子（アミノ酸配列；配列番号：1、塩基配列；配列番号：8）を導入することにより、酵母、植物細胞（タバコ培養細胞）、そして植物体（タバコ）の耐塩性を強化させることにも成功した。また、mang 1 は耐塩性の他に、熱、浸透圧、凍結等の環境ストレスに対する耐性を強化する機能を有することも確認された。

【0009】

即ち、本発明は、幅広い生物群で塩ストレスを含む環境ストレスに対する耐性を向上させることができる遺伝子を効率的に単離する方法および該方法により単離される遺伝子、並びに生物の耐塩性を強化させるための該遺伝子の利用に関し、より具体的には、

（1） 塩ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードする DNA を単離する方法であって、

（a） cDNA ライブラリーが導入された形質転換大腸菌を、形質転換前であれば実質的に生育できない塩条件下で培養し、培養後に生育しているクローンを選択する工程、および

(b) 工程 (a) で選択されたクローンから cDNA を単離する工程、を含む方法、(2) cDNA ライブラリーが導入される大腸菌が 750 mM 以上の塩化ナトリウムを含む培地でコロニー形成が抑制されるものである、(1) に記載の方法、

(3) 大腸菌が SOLR 株である、(1) に記載の方法、

(4) 工程 (a) において 350 mM 以上の NaCl を含む培地中で大腸菌の培養を行なう、(3) に記載の方法、

(5) (1) から (4) のいずれかの方法により単離しうる、塩ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードする DNA、

(6) コードするタンパク質が、さらに、熱、凍結、浸透圧、乾燥、紫外線からなる群より選択されるストレスに対する耐性を向上させる活性を有する、(5) に記載の DNA、

(7) 植物由来である、(5) または (6) に記載の DNA、

(8) マングローブ由来である、(7) に記載の DNA、

(9) 配列番号：1 から 7 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる、または該アミノ酸配列を含むタンパク質をコードする DNA、

(10) 配列番号：1 から 7 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列からなり、植物の塩ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードする DNA、

(11) 配列番号：8 から 14 のいずれかに記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であって、植物の塩ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードする DNA、

(12) 配列番号：1 から 7 のいずれかに記載のアミノ酸配列と 70 % 以上のアミノ酸配列の相同性を有するタンパク質がコードする DNA であって、植物の塩ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードする DNA、

(13) 植物の塩ストレス耐性を向上させるために用いる、(7) から (12) のいずれかに記載の DNA、

(14) (5) から (12) のいずれかに記載の DNA を含むベクター、

- (1 5) (1 4) のベクターが導入された形質転換細胞、
- (1 6) (5) から (1 2) のいずれかに記載の DNA によりコードされるタンパク質、
- (1 7) (1 5) に記載の形質転換細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から組換えタンパク質を回収する工程を含む、(1 6) に記載のタンパク質の製造方法、
- (1 8) (1 4) に記載のベクターが導入された形質転換植物細胞、
- (1 9) (1 8) に記載の形質転換植物細胞を含むトランスジェニック植物体、
- (2 0) (1 9) に記載のトランスジェニック植物体の繁殖材料、を提供するものである。

【0 0 1 0】

【発明の実施の形態】

本発明は、塩ストレスを含む環境ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードする DNA を単離する方法を提供する。大腸菌を利用して、耐塩性に関与する遺伝子をスクリーニングする場合、大腸菌自身の塩化ナトリウム (NaCl) に対する防御機構が強く働くことが問題になる。現在、分子生物学の分野で広く利用されている DH5 α , HB101, JM109 等の大腸菌は 1000 mM 以上の NaCl を含む 2YT 寒天培地でもコロニー形成能を有する。これらの株を用いて上記のスクリーニングを行った場合、cDNA の発現により耐塩性が強化されたクローンの他に、大腸菌自身の耐塩性機構が強力に働くことで耐塩性に全く関与しない cDNA が導入されたクローンも得られてしまう。実際、両者の明確な判別は極めて困難である。このような理由から、大腸菌の遺伝子発現系を利用して耐塩性関連遺伝子の選抜はこれまで全く行われていなかった。本発明者等は、他の大腸菌と比べ、耐塩性機構の働きが低下した大腸菌を見出し、これを利用することで、初めて大腸菌を利用した耐塩性関連遺伝子のスクリーニングを行なうことに成功した。

【0 0 1 1】

本発明の方法においては、まず、cDNA ライブラリーが導入された形質転換

大腸菌を、形質転換前であれば実質的に生育できない塩条件下で培養し、生育しているクローンを選択する（工程（a））。

本発明の方法で用いられる大腸菌としては、耐塩性機構の働きが低下した大腸菌が好ましい。本発明者等は、周知の市販されている大腸菌（DH5 α 、JM109、HB101）のNaClに対する最小生育阻害濃度を決定した結果、これら的大腸菌は高塩濃度（1200mMのNaCl）を含む2YT寒天培地上では著しく生育が抑制されるものの、コロニー形成を行うことが可能であった。1500mMのNaClでようやくその生育が完全に抑制された。本発明においては、このように塩化ナトリウム（NaCl）に対する防御機構が強い大腸菌を用いることは、耐塩性関連遺伝子のスクリーニングの効率を低下させるため好ましくない。

本発明の方法に用いる大腸菌は、750mM以上、好ましくは500mM以上、より好ましくは350mM以上のNaClを含む培地中でコロニー形成が抑制される大腸菌である。

本発明者らは、大腸菌の一種であるSOLR（TOYOBO社、Stratagene社、理研ジーンバンク等から市販されている）が低濃度の塩（350mM以上のNaCl）を含む寒天培地上でほとんど生育できないことを見出しており、該菌株は、本発明の方法において好適に用いることができる。

【0012】

大腸菌に導入するためのcDNAライブラリーの由来する生物種としては、特に制限はない。本発明においては、耐塩性タンパク質をコードするcDNAを単離することを望む所望の生物種より調製したcDNAライブラリーを用いることができる。特に好ましい生物としては塩生植物、例えば、マングローブ、マツバギク、シチメンソウ、ウラギク、アッケシソウ、マツナ、ハマアカザ等が挙げられるが、これらに制限されない。

cDNAライブラリーは、当業者に公知の方法で調製できる。例えば、実施例に記載のように、細胞からの全mRNAの抽出は、Ostremらの方法（Plant Physiol Vol. 84 p1270-1275（1987））に従って行なうことができる。調製したmRNAからのpoly（A）+RNA

の精製は、Oligotex-dT30<super> (第一化学社) を用いて行なうことができる。cDNAライブラリーは、精製したpoly (A+) RNAを基に、ZAP-cDNA/Gigapack Cloning Kit (Stratagene社) を利用して構築することができる。大腸菌へのcDNAライブラリーの導入は、上記のKitに含まれているSOLRとExAssist helper phageによるin vivo excision systemを利用できる。これらの操作は全て上記のキットの手引き書に従うことで容易に行うことができる。

【0013】

本発明の方法においては、このようにして調製した形質転換大腸菌を、形質転換前であれば実質的に生育できない塩条件下で培養し、生育しているクローンを選択する。大腸菌を培養するための塩条件は、大腸菌の種類に応じて適宜選択する。塩条件は、用いる大腸菌が生育できない条件であり、かつ、なるべく低い塩濃度の条件（大腸菌の塩に対する最小生育阻害濃度）であることが好ましい。例えば、SOLRは300 mMのNaClで著しく生育が抑制され、400 mMのNaClでその生育が完全に抑制される。このため大腸菌としてSOLRを用いた場合には、約400 mMのNaClを含む培地で培養を行ない、耐塩性タンパク質をコードするDNAで形質転換されたSOLRの選抜を行なえばよい。

生育しているクローンの選択は、例えば、寒天培地等で大腸菌を培養し、上記塩条件下でも形成されるコロニーを選択すればよい。選抜のための大腸菌の培養時間は、通常、8時間から20時間であり、培養温度は37度程度が好適である。

【0014】

本発明においては、次いで、工程(a)で選択されたクローンからcDNAを単離する(工程(b))。大腸菌からのcDNAの単離、即ち選抜された形質転換大腸菌からのプラスミドDNAの抽出は、文献(Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (1987)))に示された方法が一般的であり、好適である。

【0015】

目的の大腸菌を得るためのスクリーニングは、複数回繰り返して行なうこともできる。例えば、cDNAライブラリーが導入された大腸菌を、まず、最小生育阻害濃度の塩を含む培地で培養して、この条件で生育するにクローンを選抜する（一次スクリーニング）。次いで、選抜したクローンからcDNAを単離し、これを大腸菌に再度導入して、最小生育阻害濃度よりも高い塩を含む培地で該大腸菌を培養し、この条件で生育するにクローンを選抜する（二次スクリーニング）。このようにスクリーニングを繰り返すことで、塩耐性関連遺伝子の単離の効率を高めることができる。

【0016】

本発明は、また、上記の耐塩性関連遺伝子の単離方法を利用して単離される耐塩性関連遺伝子を提供する。本発明者等は、上記方法を利用して、*Bruguiera sexangula*の耐塩性に関与すると考えられる7種のcDNAを単離することに成功した。単離したcDNAの塩基配列を配列番号：8から14に、該cDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1から7に示す。

【0017】

配列番号：1に示されるアミノ酸配列は、*Swiss protein*, *PIR*等のデータベース中に相同性を有するタンパク質が登録されていないことから、新規のタンパク質と考えられた。そこで、本発明者らは、このタンパク質をマングリン (*mangrin*) と、該タンパク質がコードする遺伝子を *mangl* と命名した。一方、配列番号：2に示されるアミノ酸配列は *Arabidopsis thaliana* の *t-complex polypeptide 1* (*pir JN0448*) と約90%の相同性を有した。配列番号：3に示されるアミノ酸配列は、*Ricinus communis* の *Metallothionein-like protein TYPE2* (*EMBL L02306*) と約80%の相同性を有した。配列番号：4に示されるアミノ酸配列は *Homo sapiens* の *RubB-like DNA helicase* (*AB024301*) と約63%の相同性を有した。配列番号：5に示されるアミノ酸配列は

*Rattus norvegicus*のRibosomal protein S29 (pir S30298) と約45%の相同性を有した。配列番号：6に示されるアミノ酸配列はZea maysのElongation factor eEF-1 alpha chain (pir S66339) と約90%の相同性を有した。配列番号：7に示されるアミノ酸配列は、Schizosaccharomyces pombeのcdc21 (pir S26640) と約70%の相同性を有した。

【0018】

配列番号：1から7に示したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするcDNA（それぞれ配列番号：8から14）は、実際に大腸菌の耐塩性を向上させる機能を有することから大腸菌等の原核生物から植物を含む真核生物の耐塩性を強化する機能を有するものと考えられた。これらの遺伝子及びそれらと最も相同性が高い遺伝子（即ち、T-complex polypeptide 1、Metallothionein-like protein TYPE 2、RubB-like DNA-helicase、Ribosomal protein S29、Elongation factor eEF-1 alpha chainをコードする遺伝子）を各種生物に導入することで耐塩性が強化されたという報告はこれまでになく、本発明者等により初めて見出されたものである。

配列番号：4から7に示したアミノ酸配列は、タンパク質の全長をコードしたものではないと考えられるが、それ自体に塩ストレス耐性を強化させる活性が存在したため、それぞれの全長タンパク質の機能領域であるといえる。本発明は、これら機能領域を含む全長タンパク質および該全長タンパク質をコードするDNAを含むものである。

部分長cDNAを基に全長cDNAを単離する方法としては、例えば、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech社)、3'-Full RACE Core Set (宝酒造社)、5'-Full RACE Core Set (宝酒造社)等のキットを用い、それらの手引き書に従うのが適当である。

【0019】

本発明は、また、上記配列番号：1から7に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを包含する。一般に、生理活性を有するタンパク質で、少数のアミノ酸が置換、欠失、挿入があっても、その生理活性が維持される場合があることは周知である。

タンパク質中のアミノ酸を変異させるためには、公知の種々の方法を用いることができる。また、既にいくつかのキットが市販されている。例えば、変異を導入したプライマーを合成し、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社)を用いれば容易にタンパク質中のアミノ酸を変異させることが可能である。

本発明には、配列番号：1から7に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有するタンパク質であっても、各種生物細胞（例えば、植物細胞、大腸菌、酵母など）の塩ストレス耐性を含む環境ストレス耐性を強化する活性を有すれば、それらは全て本発明の範囲に含まれる。

【0020】

また、配列番号：1から7に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAは、ハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術 (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) によっても調製することが可能である。例えば、配列番号：1から7に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする配列番号：8から14の塩基配列の全部若しくは一部をプローブとして各種生物由来のDNAライブラリーに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズするDNAを単離することにより、目的のDNAを得ることができる。このようなDNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、「42度でのハイブリダイゼーション、および1x SSC, 0.1% SDSを含む洗浄バッファーによる42度での洗浄」が好適であり、「65度でのハイブリダイゼー

ション、および0.1 x SSC, 0.1% SDSを含む洗浄バッファーによる65度での洗浄」がさらに好適である。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0021】

また、配列番号：8から14の塩基配列の情報を基に調製したオリゴヌクレオチドをプライマーとして各種生物由来のDNA（またはRNA）を鋳型にポリメラーゼ連鎖反応を行なうことによっても、目的のDNAを得ることができる。本発明においては、各種生物細胞（例えば、植物細胞、大腸菌、酵母など）の塩ストレス耐性を含む環境ストレス耐性を強化する活性を有する限り、このようなハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術を利用して単離するDNAも含まれる。

【0022】

配列番号：1から7に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、配列番号：1から7に記載のアミノ酸配列とそのアミノ酸配列において高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%以上）の配列の同一性を指す。本発明においては、このように配列番号：1から7に記載のアミノ酸配列とそのアミノ酸配列において高い相同性を有し、各種生物細胞（例えば、植物細胞、大腸菌、酵母など）の塩ストレス耐性を強化する活性を有するタンパク質をコードするDNAが含まれる。例えば、配列番号：1のアミノ酸配列は1から86番目のアミノ酸を含む領域が塩ストレス耐性を強化する活性を有することが確認できたため（図2参照）、この領域を含むアミノ酸配列をコードする遺伝子は全て本発明の範囲に含まれる。配列の相同性は、遺伝情報処理ソフトウェアのGENETYX-MAC（ソフトウェア開発株式会社）のマルチアライン機能を利用することにより決定できる。

【0023】

上記本発明のDNAは、組換えタンパク質の調製に、また、塩ストレス耐性が強化されたトランスジェニック生物の作出に利用できる。本発明のDNAを用いてトランスジェニック生物を作出する生物種としては特に限定されるものではない。例えば、用いる遺伝子の由来がマングローブである場合には、高等植物であることが好ましい。

【0024】

組換えタンパク質を調製する場合、上記本発明のDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な宿主細胞に導入して、該DNAを発現させる。次いで、発現させたタンパク質を該形質転換細胞またはその培養上清から回収する。

組換えタンパク質の発現に用いられる宿主-ベクター系としては、例えば、IMPACT-CN System (宿主: E. coli strain ER2566、ベクター: pTYB1、pYB2、pYB11、pYB12 (BioLabs社))、あるいはpET Expression System (宿主: Epicurian Coli BL21、ベクター: pET3シリーズ (Novagen社)) が挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入法としては、当業者に公知の方法、例えば、エレクトロポレーション法やヒートショック法が挙げられる(遺伝子ライブラリーの作製法、羊土社(1994)、植物細胞工学入門、学会出版センター(1998))。

組換えタンパク質を発現させるための形質転換体の培養は、当業者に一般的に用いられている方法および条件にて行なうことができる。

【0025】

発現させたタンパク質は、例えば、IMPACT-CN Systemを利用した場合にはキチンビーズ(BioLabs社)で、pET Expression Systemを利用した場合にはHis Bind Resin(Novagen社)により精製できる。

【0026】

上記本発明のDNAを、耐塩性が強化されたトランスジェニック植物の作出に利用する場合には、該DNAを植物細胞内でその発現を保証するベクターに挿入

し、これを植物細胞に導入し、トランスジェニック植物を得るために該形質転換植物細胞を再生させる。

トランスジェニック植物の作出に用いられるベクターとしては、例えば、東洋紡から市販されている pBI101、あるいは pIG121Hm (Plant J, Vol 6, p 271-282 (1994)) を好適に用いることができる。ベクターを導入する植物細胞の種類に特に制限はないが、例えばイネ、小麦、トウモロコシ、大豆、タバコ、ニンジン等が考えられる。植物細胞の形態としては、例えば、プロトプラスト、カルス、植物体の部分（リーフディスク、ヒポコチル等）がある。宿主植物細胞へのベクターの導入法としては、アグロバクテリウム法が好適であるがその他にも、例えば、ポリエチレングリコール法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などを用いることができる（モデル植物の実験プロトコル、秀潤社（1996））。

【0027】

ベクターの導入された植物細胞を植物体へ再生させる方法は、植物種により異なる。例えば、イネの場合、以下のようにして行なうことができる。完熟種子からカルス誘導を行い、これに cDNA を導入したアグロバクテリウムを感染させる。共存培養を経て、選抜培地に移し培養する。約 3 週間後カルスを再分化培地に移し、再分化するまで培養する。4、5 日馴化させた後ポットに移すことで形質転換体を再生させる（モデル植物の実験プロトコル、秀潤社（1996））。また、ニンジン、タバコ等の再生の方法としては、それぞれ加藤、庄野博士等の方法（植物組織培養の技術朝倉書店（1983））が適当である。

これによりトランスジェニック植物体が得られれば、さらに該植物体から繁殖材料（例えば、植物の種類に応じて、種子、塊根、切穂、メリクローン等の培養増殖）を得て、これを基に本発明のトランスジェニック植物を量産することが可能である。

【0028】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0029】

【実施例1】 マングローブ cDNAライブラリーの作製

マングローブ懸濁培養細胞は、Mimuraらが確立した *Bruguiera sexangula* の懸濁培養細胞系 (J Plant Res Vol. 110, p25-29 (1997)) を用いた。この培養細胞は 100 mM の NaCl を含む AA 培地を用い、500 ml フラスコに 120 ml の分量で、26℃、暗所で往復振とう培養 (70 rpm) した。マングローブの cDNA ライブラリーは、この懸濁培養細胞を用い、以下に示す手順で行った。まず、Ostreimらの方法 (Plant Physiol Vol. 84 p1270-1275 (1987)) に従って全 mRNA を抽出し、ここから Oligotex-dT 30<super> (第一化学社) を用い poly (A) + RNA を精製した。精製した poly (A+) RNA を基に cDNA を合成し、λ Zap II (Stratagene 社) ラムダファージベクターに導入して cDNA ライブラリーを構築した。λ Zap II を用いた cDNA ライブラリーの構築方法は周知の方法であり、実際の手順は Stratagene 社の手引き書に従った。その結果、 10^5 の独立クローンを含むマングローブ cDNA ライブラリーの構築に成功した。

【0030】

【実施例2】 耐塩性に関与する cDNA のスクリーニング条件の決定

マングローブ cDNA ライブラリーの中から耐塩性に関与する cDNA のスクリーニング方法として本発明者らは大腸菌の遺伝子発現系を利用した。即ち、大腸菌にマングローブ cDNA を導入し、耐塩性が強化された形質転換大腸菌を選抜することで、耐塩性に関わる cDNA を獲得する新規な方法を開発した。耐塩性が強化された形質転換大腸菌の選抜には、適当な濃度の NaCl を含む 2YT 寒天培地を用いた。このスクリーニングを開始するにあたり、本発明者らは、上記のスクリーニングに適した宿主大腸菌の選別を目的とし、各種大腸菌 (DH5α, JM109, HB101, SOLR) の NaCl に対する最小生育阻害濃度を決定した。これらの大腸菌は周知の株であり、TOYOBO 社や Stratagene 社等から市販されているものである。DH5α, JM109, 及び HB

101は1200 mMのNaClを含む2YT寒天培地上で、著しく生育が阻害されるものの、コロニー形成を行うことが可能であり、1500 mMのNaClでその生育が完全に抑制される。これに対し、SOLRは300 mMのNaClで著しく生育が抑制され、400 mMのNaClでその生育が完全に抑制される。このことから、SOLRは塩感受性の高い株であり、他の大腸菌と異なり、強力な耐塩性機構を持たないことが明らかとなった。宿主大腸菌自身の耐塩性機構が強力に働かないことは、上記のスクリーニングを行う上で非常に有効である。よって、cDNAライブラリーからの耐塩性に関与するcDNAのスクリーニングは、宿主大腸菌としてSOLRを用い、選択寒天培地のNaCl濃度を400 mMに設定し、以下に示す手順でスクリーニングを行った。

【0031】

【実施例3】 マングローブcDNAライブラリーからの耐塩性に関与するcDNAのスクリーニング

マングローブcDNAライブラリーをin vivo excision system (Stratagene社)により、pBluescript SKに組み込んだ形でSOLRに導入した。遺伝子導入は、ZAP-cDNA/Gigapack Cloning Kit (Stratagene社)の手引き書に従って行なった。マングローブcDNAが導入されたSOLRの中から耐塩性関連のcDNAが導入されたSOLRを選抜するために本発明では以下に示す2段階スクリーニングを行った。一次スクリーニングは、マングローブcDNAが導入されたSOLRを400 mM NaCl、50 μ g/mlカナマイシン、50 μ g/mlアンピシリン、0.05 mM IPTGを含む2YT寒天培地に植菌し、20時間、37℃で培養した。この条件で得られたコロニー全てを再度、上記の寒天培地に植菌し、それらの生育を観察した。その結果、耐塩性が強化された168個のクローンを獲得した。これらのクローンの中には何らかの原因で宿主大腸菌由来の耐塩性機構が強化されている可能性が考えられたため、以下に示す二次スクリーニングを行った。

【0032】

一次スクリーニングで得た各クローンからプラスミドを抽出し、これらを全て

SOLRに再導入した。新たに得られた形質転換体は、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン、 0.05 mM IPTGを含む2YT液体培地で対数増殖期になるまで培養し、これを2YT液体培地で希釈シリーズを作製し、上記の寒天選択培地に $25 \mu\text{l}$ ずつスポットした。液体が乾くまで風乾した後、 37°C で一晩培養した。この結果、30のクローンに明らかな耐塩性の向上が確認された。代表例として、図1に配列番号：1に示したcDNAが導入された大腸菌のスポット実験の結果を示す。次に、この30クローンに導入されたcDNAの塩基配列をThermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham社) 及びDNAシーケンサーLIC-4000L (LI-COR) を用い、製造者の手引き書に従って決定した。その結果、30個のクローンから得られたcDNAは7種類に分類できた。即ち、配列番号：1に示したアミノ酸配列をコードするcDNAを23個、配列番号：2に示したアミノ酸配列をコードするcDNAを1個、配列番号：3に示したアミノ酸配列をコードするcDNAを2個、配列番号：4に示したアミノ酸配列をコードするcDNAを2個、配列番号：5に示したアミノ酸配列をコードするcDNAを1個、配列番号：6に示したアミノ酸配列をコードするcDNAを1個、配列番号：7に示したアミノ酸配列をコードするcDNAを1個を獲得した。BLAST相同性検索プログラムを用い、これらのDNAがコードするアミノ酸配列の相同性検索を行った。

【0033】

その結果、配列番号：1に示されるアミノ酸配列はSwiss protein, PIR等のデータベース中に相同性を有するタンパク質が登録されていないことから、新規のタンパク質と考えられた。そこで、本願発明者らはこのcDNAがコードする新規のタンパク質（総アミノ酸数、141）をマングリン (mangrin)、この遺伝子をmang1と命名した。次に、マングリンの機能領域の決定を試みた。16, 42, 65, 87, 109, 142番目のアミノ酸に終止コドンを導入したサブクローンを作製し、これをSOLRに導入して上記のスポット実験を行った結果、1から86番目のアミノ酸配列が耐塩性強化に関わる領域であることが明らかとなった（図2）。

【0034】

配列番号：2に示されるアミノ酸配列は*Arabidopsis thaliana*のt-complex polypeptide 1 (pir JN0448)と約90%の相同性を有した。配列番号：3に示されるアミノ酸配列は、*Ricinus communis*のMetallothionein-like protein TYPE 2 (EMBL L02306)と約80%の相同性を有した。配列番号：4に示されるアミノ酸配列は*Homo sapiens*のRubB-like DNA helicase (AB024301)と約63%の相同性を有した。配列番号：5に示されるアミノ酸配列は*Rattus norvegicus*のRibosomal protein S29 (pir S30298)と約45%の相同性を有した。配列番号：6に示されるアミノ酸配列は*Zea mays*のElongation factor eEF-1 alpha chain (pir S66339)と約90%の相同性を有した。配列番号：7に示されるアミノ酸配列の*Schizosaccharomyces pombe*のcdc21 (pir S26640)と約70%の相同性を有した。配列番号：1から7に示したタンパク質をコードするcDNA（それぞれ配列番号：8から14）は、実際に大腸菌の耐塩性を向上させる機能を有することから大腸菌等の原核生物から高等植物を含む幅広い生物群の耐塩性を強化する機能を有するものと考えられる。

【0035】

【実施例4】 酵母におけるマングローブcDNAの効果

配列番号：1に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列がクローニングされたpBluescript SKを制限酵素EcoRI, NotIで切断し、これをアガロースゲル電気泳動した。ここで得られた約1kbの断片を切り出し、GENECLEAN Kit (BIO101社)で精製した。これをLigation Kit ver2 (宝酒造)を用い、制限酵素EcoRI, NotIで切断した、酵母発現ベクターpYES2 (Invitrogen)に導入した。次に、これをエレクトロポレーション法により酵母に導入した。酵母は*Saccharomyces cerevisiae* YM4271 (Clontech

社)を使用した。形質転換酵母の選択にはウラシルを含まないSD寒天培地(以下、-UraSD寒天培地)を用いた。形質転換酵母の耐塩性の評価は以下のように行った。対数増殖期後期まで-UraSD培地で培養した形質転換酵母を1200mMのNaClを含む-UraSD培地、及びNaClを含まない-UraSD培地に植菌(初期濃度 $OD_{600}=0.1$)し、30℃で振とう培養を開始した。24時間ごとに細胞懸濁液を採取し、その吸光度を測定した。吸光度の測定には島津製作所のUV-1200を利用した。比較としてベクターであるpYES2のみを導入した酵母についても同様な検討を行った。その結果を図3に示した。図3からも明らかなように、スクリーニングの結果得られたcDNAは酵母においても、大腸菌の場合と同様に耐塩性を強化する機能を有することが確認された。

【0036】

【実施例5】 タバコ培養細胞におけるマングローブcDNAの効果

配列番号: 1に示したアミノ酸配列をコードした塩基配列がクローニングされているpBluescript SKを制限酵素XbaI, XhoIで切断し、これをアガロースゲル電気泳動した。ここで得られた約1kbの断片を切り出し、GENECLEAN Kit (BIO101)で精製した。これをLigation Kit ver2(宝酒造社)を用い、植物発現ベクターpBI101(EMBOJ Vol6, p3901-3907(1987))の制限酵素EcoRI, NotIサイトに導入した。得られたプラスミドをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに導入し、これをタバコ培養細胞(Nicotiana tabacum L. Cv. Bright Yellow 2)に感染させた。アグロバクテリウムを用いた植物細胞への遺伝子導入法は周知の方法である。ここでは、アグロバクテリウムにAgrobacterium tumefaciens EHA 101を用い、Anの方法(Plant Physiol Vol. 79, p568-570(1985))に従った。

形質転換タバコ培養細胞の耐塩性の評価は以下のように行った。形質転換タバコ培養細胞のカルスを拾い、Lins-Mayer培地で対数増殖期後期まで培養した。これをNaCl濃度0, 100, 及び150mMとなるように調整した4

5 ml の Lins-Mayer 培地にそれぞれ 1 ml の割合で植え継ぎ、26℃で振とう培養を開始した。培養開始後、7日または13日目の細胞懸濁液から細胞を回収し、その湿重量を測定した。比較として、マングローブ cDNA のかわりに、pBI101 を用いて GUS 遺伝子を導入したタバコ培養細胞についても同様な検討を行った。

その結果を図4に示した。図4からも明らかなように、スクリーニングの結果得られた cDNA はタバコ培養細胞においても大腸菌の場合と同様に、耐塩性を強化する機能を有することが確認された。

【0037】

【実施例6】タバコ（植物体）におけるマングローブ cDNA の効果

実施例5で得られたプラスミドをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに導入し、これをタバコリーフディスクに感染させた。アグロバクテリウムを用いたタバコリーフディスクへの遺伝子導入法は周知の方法である。ここでは、アグロバクテリウムに *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 を用い、植物細胞工学入門（学会出版センター（1998））記載の方法に従った。形質転換タバコ（植物体）の耐塩性の評価は以下のように行った。形質転換タバコを NaCl 濃度 150 mM となるように調整した MS 寒天培地に植え継ぎ、26℃、明暗周期の光照射下（明：16時間／暗：8時間）で培養した。培養開始30日後の植物体の生育を観察し、その耐塩性を評価した。マングローブ cDNA のかわりに、pBI101 を用いて GUS 遺伝子を導入したタバコ培養細胞についても同様な検討を行った。

その結果を図5に示した。図5からも明らかなように、スクリーニングの結果得られた cDNA を導入したタバコ植物体は、NaCl 存在下においても根、葉、茎の生長が良好であった。このことから、スクリーニングの結果得られた cDNA は植物体レベルにおいても耐塩性強化機能を有することが確認された。

【0038】

【実施例7】各種環境ストレスに対するマングローブ cDNA の効果

【0039】

（1）熱ストレス

配列番号：1に示したアミノ酸配列をコードした塩基配列がクローニングされているpBluescript SKが導入されたSOLRを50 μ g/mlカナマイシン、50 μ g/mlアンピシリン、0.05 mM IPTGを含む2YT液体培地で37度、および40度で培養した。対照としてベクターであるpBluescript SKが導入されたSOLRについても同様な検討を行った。その結果を図6に示した。図6からも明らかなように、スクリーニングの結果得られたcDNAは耐熱性を強化する機能を有することが確認された。

【0040】

(2) 浸透圧ストレス

配列番号：1に示したアミノ酸配列をコードした塩基配列がクローニングされているpBluescript SKが導入されたSOLRを50 μ g/mlカナマイシン、50 μ g/mlアンピシリン、0.05 mM IPTGを含む2YT液体培地で対数増殖期になるまで培養し、これを2YT液体培地で希釈シリーズを作製し、800 mMの2YT寒天選択培地に25 μ lずつスポットした。液体が乾くまで風乾した後、37℃で一晩培養した。その結果を図7に示した。図7からも明らかなように、スクリーニングの結果得られたcDNAは浸透圧耐性を強化する機能を有することが確認された。

【0041】

(3) 凍結ストレス

配列番号：1に示したアミノ酸配列をコードした塩基配列がクローニングされているpBluescript SKを導入したSOLRを50 μ g/mlカナマイシン、50 μ g/mlアンピシリン、0.05 mM IPTGを含む2YT液体培地で対数増殖期になるまで培養し、これを2YT液体培地で5000 cells/25 μ lになるように希釈した。これをプラスチックチューブに移し、3分間の液体窒素による凍結と37度10分間の融解を繰り返した。融解時の菌体懸濁液の一部(25 μ l)を採取し、SOLRを50 μ g/mlカナマイシン、50 μ g/mlアンピシリン、0.05 mM IPTGを含む2YT寒天培地にスポットした。比較としてベクターであるpBluescript SKが導入されたSOLRについても同様な検討を行った。その結果を図8に示した。図

8からも明らかなように、スクリーニングの結果得られた cDNA は凍結ストレスに対する耐性を強化する機能を有することが確認された。

【0042】

【発明の効果】

本発明は、各種生物の環境ストレスに対する耐性を強化する有効な手段になる。特に環境ストレス耐性が強化された植物はこれまで生育が困難であった塩害土壌、寒冷地、砂漠、海洋での生育が促進され、これにより、農地の拡大による農産物生産の増加が期待できる。また、環境ストレス耐性が強化された植物は、緑地環境の増大や砂漠緑化につながると同時に、地球規模において CO₂ 濃度の増大による地球温暖化現象の抑制に貢献するものである。

【0043】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamada, Akiyo
Ozeki, Yoshihiro
Saito, Takeo

<120> Screening of genes to give tolerance against environmental stress
and the applications

<130> YOS-2

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 141

<212> PRT

<213> Bruguiera sexangula

<400> 1

Met Ala Leu Ser Ser Ser Ala Leu Arg Thr Val Ser Ser Ser Val Lys
1 5 10 15

Val Val Gly Pro Ala Arg Ser Lys Ser Ala Thr Val Pro Thr Gln Thr
20 25 30

Val Leu Pro Phe Lys Phe Thr Asn Pro Ser Leu Leu Thr Arg Ser Leu
35 40 45

Ser Phe Ser Ser Lys Gly Ser Ser Phe Asp Ser Phe Ser Val Pro Lys
50 55 60

Arg Ser Phe Ser Cys Arg Ser Gln Ala Thr Pro Ser Asp Asp Ala Ser
65 70 75 80

Arg Pro Thr Lys Val Gln Glu Leu Cys Val Tyr Glu Met Asn Glu Arg
85 90 95

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Val Leu Arg Leu Ser Gln Lys Pro Val Asn

100

105

110

Ser Leu Gly Asp Leu Val Pro Phe Ser Asn Lys Val Tyr Ser Gly Asp

115

120

125

Leu Gln Lys Arg Ile Gly Val Thr Ala Glu Tyr Ala Ser

130

135

140

<210> 2

<211> 546

<212> PRT

<213> Bruguiera sexangula

<400> 2

Met Ala Ile Ala Ala Gln Thr Pro Asp Ile Leu Gly Glu Arg Gln Ser

1

5

10

15

Gly Gln Asp Val Arg Thr Gln Asn Val Val Ala Cys Gln Ala Val Ala

20

25

30

Asn Ile Val Lys Ser Ser Leu Gly Pro Val Gly Leu Asp Lys Met Leu

35

40

45

Val Asp Asp Ile Gly Asp Val Thr Ile Thr Asn Asp Gly Ala Thr Ile

50

55

60

Leu Lys Met Leu Glu Val Glu His Pro Ala Ala Lys Val Leu Val Glu

65

70

75

80

Leu Ala Glu Leu Gln Asp Arg Glu Val Gly Asp Gly Thr Thr Ser Val
85 90 95

Val Ile Ile Ala Ala Glu Leu Leu Lys Arg Ala Asn Asp Leu Val Arg
100 105 110

Asn Lys Ile His Pro Thr Ser Ile Ile Ser Gly Tyr Arg Leu Ala Met
115 120 125

Arg Glu Ala Cys Lys Tyr Val Glu Glu Lys Leu Ser Met Lys Val Glu
130 135 140

Lys Leu Gly Lys Asp Ser Leu Val Asn Cys Ala Lys Thr Ser Met Ser
145 150 155 160

Ser Lys Leu Ile Ala Gly Asp Ser Asp Phe Phe Ala Asn Leu Val Val
165 170 175

Asp Ala Val Gln Ala Val Lys Met Thr Asn Ala Arg Gly Glu Ile Lys
180 185 190

Tyr Pro Ile Lys Ser Ile Asn Ile Leu Lys Ala His Gly Lys Ser Ala
195 200 205

Arg Asp Ser Cys Leu Leu Asn Gly Tyr Ala Leu Asn Thr Gly Arg Ala
210 215 220

Ala Gln Gly Met Pro Met Arg Val Ala Pro Ala Arg Ile Ala Cys Leu

225 230 235 240

Asp Phe Asn Leu Gln Lys Thr Lys Met Gln Leu Gly Val Gln Val Leu

245 250 255

Val Thr Asp Pro Arg Glu Leu Glu Arg Ile Arg Gln Arg Glu Ala Asp

260 265 270

Met Thr Lys Glu Arg Ile Glu Lys Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asn Val

275 280 285

Val Leu Thr Thr Lys Gly Ile Asp Asp Met Ala Leu Lys Tyr Phe Val

290 295 300

Glu Ala Gly Ala Ile Ala Val Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Met Arg

305 310 315 320

His Val Ala Lys Ala Thr Gly Ala Thr Leu Val Ser Thr Phe Ala Asp

325 330 335

Met Glu Gly Glu Glu Thr Phe Asp Ser Ser Leu Leu Gly Gln Ala Glu

340 345 350

Glu Val Val Glu Glu Arg Ile Ala Asp Asp Asp Val Ile Met Ile Lys

355 360 365

Gly Thr Lys Thr Thr Ser Ala Val Ser Leu Ile Leu Arg Gly Ala Asn

370 375 380

Asp Tyr Met Leu Asp Glu Met Glu Arg Ala Leu His Asp Ala Leu Cys
385 390 395 400

Ile Val Lys Arg Thr Leu Glu Ser Asn Thr Val Val Ala Gly Gly Gly
405 410 415

Ala Val Glu Ala Ala Leu Ser Val His Leu Glu Tyr Leu Ala Thr Thr
420 425 430

Leu Gly Ser Arg Glu Gln Leu Ala Ile Ala Glu Phe Ala Glu Ser Leu
435 440 445

Leu Ile Ile Pro Lys Val Leu Ala Val Asn Ala Ala Lys Asp Ala Thr
450 455 460

Glu Leu Ala Ala Lys Leu Arg Ala Tyr His His Thr Ala Gln Thr Lys
465 470 475 480

Ala Asp Lys Lys His Leu Ser Ser Met Gly Leu Asp Leu Ser Lys Gly
485 490 495

Thr Ile Arg Asn Asn Leu Glu Ala Gly Val Ile Glu Pro Ala Met Ser
500 505 510

Lys Ile Lys Ile Ile Gln Phe Ala Thr Glu Ala Ala Ile Thr Ile Leu
515 520 525

Arg Ile Asp Asp Met Ile Lys Leu Val Lys Asp Glu Thr Gln Asn Glu
530 535 540

Glu Glu

545

<210> 3

<211> 79

<212> PRT

<213> *Bruguiera sexangula*

<400> 3

Met Ser Cys Cys Gly Gly Asn Cys Gly Cys Gly Ala Ser Cys Asn Cys
1 5 10 15

Gly Asn Gly Cys Gly Gly Cys Lys Met Tyr Pro Asp Met Gly Phe Ala
20 25 30

Glu Lys Thr Thr Thr Glu Thr Leu Val Leu Gly Val Gly Pro Glu Arg
35 40 45

Ala His Phe Glu Gly Ala Glu Met Gly Val Pro Ala Glu Asn Gly Gly

50

55

60

Cys Lys Cys Gly Ser Asn Cys Thr Cys Asp Pro Cys Thr Cys Lys
65 70 75

<210> 4

<211> 334

<212> PRT

<213> Bruguiera sexangula

<400> 4

Ile Glu Gly Glu Val Val Glu Val Gln Ile Asp Arg Pro Ala Val Thr
1 5 10 15

Gly Ala Ala Ser Lys Thr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Thr Thr Glu Met
20 25 30

Glu Thr Val Tyr Asp Leu Gly Ala Lys Met Ile Glu Ala Leu Gly Lys
35 40 45

Glu Lys Val Gln Ser Gly Asp Val Ile Ala Ile Asp Lys Ala Ser Gly
50 55 60

Lys Ile Thr Lys Leu Gly Arg Ser Phe Ser Arg Ser Arg Asp Tyr Asp
65 70 75 80

Ala Met Gly Pro Gln Val Lys Phe Val Gln Cys Pro Asp Gly Glu Leu
85 90 95

Gln Lys Arg Lys Glu Val Val His Cys Val Ser Leu His Glu Ile Asp
100 105 110

Val Ile Asn Ser Arg Thr Gln Gly Phe Leu Ala Leu Phe Thr Gly Asp
115 120 125

Thr Gly Glu Ile Arg Ala Glu Val Arg Glu Gln Ile Asp Thr Lys Val

130	135	140
Ala Glu Trp Arg Glu Glu Gly Lys Ala Glu Ile Val Pro Gly Val Leu		
145	150	155
Phe Ile Asp Glu Val His Met Leu Asp Ile Glu Cys Phe Ser Phe Leu		
165	170	175
Asn Arg Ala Leu Glu Asn Glu Met Ala Pro Ile Leu Val Val Ala Thr		
180	185	190
Asn Arg Gly Ile Thr Thr Ile Arg Gly Thr Asn Tyr Lys Ser Pro His		
195	200	205
Gly Ile Pro Ile Asp Leu Leu Asp Arg Leu Leu Ile Ile Thr Thr Gln		
210	215	220
Pro Tyr Thr Lys Asp Glu Ile Arg Lys Ile Leu Asp Ile Arg Cys Gln		
225	230	235
Glu Glu Asp Val Glu Met Ala Glu Glu Ala Lys Ala Leu Leu Thr His		
245	250	255
Ile Gly Ala Glu Thr Ser Leu Arg Tyr Ala Ile His Leu Ile Thr Ala		
260	265	270
Ala Ala Leu Ala Cys Gln Lys Arg Lys Gly Lys Leu Val Glu Thr Glu		
275	280	285

Asp Ile Ser Arg Ala Tyr Asn Leu Phe Leu Asp Val Lys Arg Ser Thr
290 295 300

Gln Tyr Leu Ile Glu Tyr Gln Asn Gln Tyr Met Phe Asn Glu Ala Pro
305 310 315 320

Val Gly Glu Gly Asp Glu Glu Gly Ala Asn Ala Met Leu Ser
325 330

<210> 5

<211> 37

<212> PRT

<213> Bruguiera sexangula

<400> 5

Ala Cys Arg Val Cys Gly Asn Pro His Gly Leu Ile Arg Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Leu Met Cys Cys Arg Gln Cys Phe Arg Ser Asn Ala Lys Glu Ile Gly
20 25 30

Phe Ile Lys Tyr Arg
35

<210> 6

<211> 232

<212> PRT

<213> Bruguiera sexangula

<400> 6

Glu Ala Leu Asp Met Ile Gln Glu Pro Lys Arg Pro Ser Asp Lys Pro

1 5 10 15

Leu Arg Leu Pro Leu Gln Asp Val Tyr Lys Ile Gly Gly Ile Gly Thr

20 25 30

Val Pro Val Gly Arg Val Glu Thr Gly Val Leu Lys Pro Gly Met Val

35 40 45

Val Thr Phe Gly Pro Ser Gly Leu Thr Thr Glu Val Lys Ser Val Glu

50 55 60

Met His His Glu Ala Leu Gln Glu Ala Leu Pro Gly Asp Asn Val Gly

65 70 75 80

Phe Asn Val Lys Asn Val Ser Val Lys Asp Leu Lys Arg Gly Tyr Val

85 90 95

Ala Ser Asn Ser Lys Asp Asp Pro Ala Lys Glu Ala Ser Ser Phe Thr

100 105 110

Ser Gln Val Ile Ile Met Asn His Pro Gly Gln Ile Gly Asn Gly Tyr

115 120 125

Ala Pro Val Leu Asp Cys His Thr Ser His Ile Ala Val Lys Phe Ser

130 135 140

Glu Ile Leu Thr Lys Ile Asp Arg Arg Ser Gly Lys Glu Leu Glu Lys
145 150 155 160

Glu Pro Lys Phe Leu Lys Asn Gly Asp Ala Gly Phe Val Lys Met Ile
165 170 175

Pro Thr Lys Pro Met Val Val Glu Thr Phe Ser Glu Tyr Pro Pro Leu
180 185 190

Gly Arg Phe Ala Val Arg Asp Met Arg Gln Thr Val Ala Val Gly Val
195 200 205

Ile Lys Ser Val Glu Lys Lys Glu Pro Ser Gly Ala Lys Val Thr Lys
210 215 220

Ser Ala Ala Lys Lys Gly Gly Lys
225 230

<210> 7

<211> 256

<212> PRT

<213> Bruguiera sexangula

<400> 7

Asp Asp Met Asp Glu Ala Thr Pro Thr Phe Val Trp Gly Thr Asn Ile
1 5 10 15

Ser Val Gln Asp Val Lys Ala Ala Ile Gln Met Phe Leu Lys His Phe
20 25 30

Arg Asp Ser Asn Gln Ser Gln Arg Asn Glu Ile Phe Glu Glu Gly Lys
35 40 45

Tyr Val Lys Ala Ile His Lys Val Leu Glu Val Glu Gly Glu Ser Leu
50 55 60

Asp Val Asp Ala Arg Asp Val Phe Asp Tyr Asp Ser Asp Leu Tyr Ala
65 70 75 80

Lys Met Ile Arg Tyr Pro Leu Glu Val Leu Ala Ile Phe Asp Ile Val
85 90 95

Leu Met Asp Ile Val Ser Leu Ile Asn Pro Leu Phe Glu Lys His Val
100 105 110

Gln Val Arg Ile Phe Asn Leu Lys Thr Ser Ile Thr Met Arg Asn Leu
115 120 125

Asn Pro Ser Asp Ile Glu Lys Met Val Ser Leu Lys Gly Met Ile Ile
130 135 140

Arg Cys Ser Ser Ile Ile Pro Glu Ile Arg Glu Ala Val Phe Arg Cys
145 150 155 160

Leu Val Cys Gly Tyr Phe Ser Asp Pro Ile Val Val Asp Arg Gly Arg
165 170 175

Ile Ser Glu Pro Lys Ala Cys Leu Lys Glu Glu Cys Leu Thr Lys Asn
 180 185 190

Ser Met Thr Leu Val His Asn Arg Cys Arg Phe Ala Asp Lys Gln Ile
 195 200 205

Val Arg Leu Gln Glu Thr Pro Asp Glu Ile Pro Glu Gly Gly Thr Pro
 210 215 220

His Thr Val Ser Leu Leu Met His Asp Lys Leu Val Asp Ala Gly Lys
 225 230 235 240

Pro Gly Asp Arg Val Glu Val Thr Gly Ile Tyr Arg Ala Met Ser Val
 245 250 255

<210> 8

<211> 1018

<212> DNA

<213> *Bruguiera sexangula*

<220>

<221> CDS

<222> (42)..(464)

<400> 8

gtccaaacag ccagagagaa acgacaacat cgaccaagaa a atg gct ctt tca agc 56

Met Ala Leu Ser Ser

1

5

tct gct ctg aga acc gtc tct tct tct gtg aag gtg gtc ggc cct gca 104
Ser Ala Leu Arg Thr Val Ser Ser Ser Val Lys Val Val Gly Pro Ala
10 15 20

aga tca aag agt gct act gta ccc acc caa aca gta ttg cct ttc aag 152
Arg Ser Lys Ser Ala Thr Val Pro Thr Gln Thr Val Leu Pro Phe Lys
25 30 35

ttc aca aac ccg tgc tta ctc act cga tgc cta agc ttt tca tca aaa 200
Phe Thr Asn Pro Ser Leu Leu Thr Arg Ser Leu Ser Phe Ser Ser Lys
40 45 50

ggt tca agc ttt gac agc ttc tct gta ccc aaa aga tct ttt tct tgc 248
Gly Ser Ser Phe Asp Ser Phe Ser Val Pro Lys Arg Ser Phe Ser Cys
55 60 65

aga agc caa gcc act cca tct gat gat gcc tca aga ccc acc aaa gtt 296
Arg Ser Gln Ala Thr Pro Ser Asp Asp Ala Ser Arg Pro Thr Lys Val
70 75 80 85

caa gag ctg tgt gtg tat gag atg aac gag aga gat cgt gga agc cct 344
Gln Glu Leu Cys Val Tyr Glu Met Asn Glu Arg Asp Arg Gly Ser Pro
90 95 100

gct gtt ctc cgg ttg agc cag aaa cct gtt aat tct ctc ggc gat ctc 392
Ala Val Leu Arg Leu Ser Gln Lys Pro Val Asn Ser Leu Gly Asp Leu
105 110 115

gtg cct ttc agt aac aaa gtt tac agc gga gac ctg cag aag cga att 440

Val Pro Phe Ser Asn Lys Val Tyr Ser Gly Asp Leu Gln Lys Arg Ile

120

125

130

gga gta acc gca gaa tat gca tcc tgatccaaaa caagccagaa aaaaagggtg 494

Gly Val Thr Ala Glu Tyr Ala Ser

135

140

atcgctttga agcgatatat agcttttatt tcggtggcta tggtcacatt gctgtgcaag 554

gcgcatactt gacctacgag gacacgcacc ttgctgtgac gggcgggtcg ggcatatttg 614

aaggagtgtc tggtcagggtt aagctgcage aactcgtgta ccttttcaag ctcttctaca 674

ctttctactt gcgaggcatc aaggacttgc cggaggagct tacgaagaag ccggttgagc 734

cccacccttc tgttgagccg atgccggcgg ccaaggcttg cgagccacat gccgttggtg 794

ctaatttcac cgattagtga ttaattgtcc ttttggggtt cggatgaact tgagttagct 854

tacagttgca caacgttatg gcgcgagaca cgagagggaa ccttagccat aagaaaatta 914

ataatctcac ggtgctttta ttttgattct tctattagtt gaatcgtaa tgaaagtgga 974

ccaaattggc tgttttacgt tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

1018

<211> 2060

<212> DNA

<213> Bruguiera sexangula

<220>

<221> CDS

<222> (81)..(1718)

<400> 9

cgaaattcct ctactaaca taccagatcc agtctagcgt ttcgattttc tgcttcacat 60

ttctgtttct ttgaccagaa atg gca atc gcg gct caa act ccg gac att ctc 113

Met Ala Ile Ala Ala Gln Thr Pro Asp Ile Leu

1

5

10

ggc gaa cgt cag tcc ggc cag gac gtc cgc act caa aat gtg gtg gca 161

Gly Glu Arg Gln Ser Gly Gln Asp Val Arg Thr Gln Asn Val Val Ala

15

20

25

tgt caa gcg gtt gcc aat att gtc aaa tct tca ctt ggt cct gtc gga 209

Cys Gln Ala Val Ala Asn Ile Val Lys Ser Ser Leu Gly Pro Val Gly

30

35

40

ctc gac aag atg cta gtg gat gat att ggt gat gta aca att aca aat 257

Leu Asp Lys Met Leu Val Asp Asp Ile Gly Asp Val Thr Ile Thr Asn

45

50

55

gat ggt gct acg att ctt aag atg tta gaa gta gag cat cct gca gca 305

Asp Gly Ala Thr Ile Leu Lys Met Leu Glu Val Glu His Pro Ala Ala

60

65

70

75

aag gtg ctc gtg gag ttg gct gag ctt caa gac cga gaa gtt gga gat 353

Lys Val Leu Val Glu Leu Ala Glu Leu Gln Asp Arg Glu Val Gly Asp

80

85

90

gga acc act tcg gtt gtc atc ata gca gct gag ttg ctc aag aga gca 401

Gly Thr Thr Ser Val Val Ile Ile Ala Ala Glu Leu Leu Lys Arg Ala

95

100

105

aat gat ctc gtg agg aat aag atc cac cca aca tca ata atc agt gga 449

Asn Asp Leu Val Arg Asn Lys Ile His Pro Thr Ser Ile Ile Ser Gly

110

115

120

tac agg ctt gct atg agg gaa gca tgc aag tat gtt gaa gag aaa ttg 497

Tyr Arg Leu Ala Met Arg Glu Ala Cys Lys Tyr Val Glu Glu Lys Leu

125

130

135

tca atg aag gtt gaa aag ctt gga aaa gat tct cta gta aac tgt gca 545

Ser Met Lys Val Glu Lys Leu Gly Lys Asp Ser Leu Val Asn Cys Ala

140

145

150

155

aag aca agc atg tcc tca aag ttg ata gct ggt gac agc gac ttc ttt 593

Lys Thr Ser Met Ser Ser Lys Leu Ile Ala Gly Asp Ser Asp Phe Phe

160

165

170

gca aat ttg gtt gta gat gct gta caa gca gta aag atg acc aat gca 641

Ala Asn Leu Val Val Asp Ala Val Gln Ala Val Lys Met Thr Asn Ala

175

180

185

cgg ggg gaa atc aaa tat cct atc aag agt ata aat att ttg aaa gct 689
 Arg Gly Glu Ile Lys Tyr Pro Ile Lys Ser Ile Asn Ile Leu Lys Ala
 190 195 200

cat gga aaa agt gca aga gat agc tgc ctt ttg aat ggc tat gct ctc 737
 His Gly Lys Ser Ala Arg Asp Ser Cys Leu Leu Asn Gly Tyr Ala Leu
 205 210 215

aat act ggt cgt gct gct caa ggg atg cct atg aga gtt gca cct gca 785
 Asn Thr Gly Arg Ala Ala Gln Gly Met Pro Met Arg Val Ala Pro Ala
 220 225 230 235

agg att gct tgt ctt gac ttt aat ctt cag aaa acg aag atg caa ttg 833
 Arg Ile Ala Cys Leu Asp Phe Asn Leu Gln Lys Thr Lys Met Gln Leu
 240 245 250

ggt gta caa gtc tta gtc act gat ccc agg gag ctt gaa aga att cgt 881
 Gly Val Gln Val Leu Val Thr Asp Pro Arg Glu Leu Glu Arg Ile Arg
 255 260 265

caa aga gaa gct gat atg aca aag gaa cgg att gag aaa ctc ctg aaa 929
 Gln Arg Glu Ala Asp Met Thr Lys Glu Arg Ile Glu Lys Leu Leu Lys
 270 275 280

gct gga gca aat gtt gtt cta acc aca aag gga att gat gac atg gca 977
 Ala Gly Ala Asn Val Val Leu Thr Thr Lys Gly Ile Asp Asp Met Ala
 285 290 295

ctt aaa tat ttt gtg gag gct ggg gct att gct gtg aga cgt gtt cgg 1025
 Leu Lys Tyr Phe Val Glu Ala Gly Ala Ile Ala Val Arg Arg Val Arg
 300 305 310 315

aaa gag gat atg cgc cat gtt gcc aag gca act ggt gca aca ctg gtt 1073
 Lys Glu Asp Met Arg His Val Ala Lys Ala Thr Gly Ala Thr Leu Val
 320 325 330

tca aca ttt gct gac atg gaa gga gag gaa aca ttt gat tca tca ctg 1121
 Ser Thr Phe Ala Asp Met Glu Gly Glu Glu Thr Phe Asp Ser Ser Leu
 335 340 345

ctt gga caa gct gaa gaa gtt gtg gag gag cgc att gct gat gac gat 1169
 Leu Gly Gln Ala Glu Glu Val Val Glu Glu Arg Ile Ala Asp Asp Asp
 350 355 360

gtg att atg ata aaa ggg aca aag act aca agt gcg gtt tcc ttg att 1217
 Val Ile Met Ile Lys Gly Thr Lys Thr Thr Ser Ala Val Ser Leu Ile
 365 370 375

ctt cgt ggt gca aat gac tat atg ctc gat gag atg gag cga gcc ctg 1265
 Leu Arg Gly Ala Asn Asp Tyr Met Leu Asp Glu Met Glu Arg Ala Leu
 380 385 390 395

cat gat gct tta tgt att gtc aag aga acc ctt gaa tct aat aca gta 1313
 His Asp Ala Leu Cys Ile Val Lys Arg Thr Leu Glu Ser Asn Thr Val
 400 405 410

gtt gca ggt gga ggt gct gtt gag gct gcc ttg tct gtg cac ttg gag 1361

Val Ala Gly Gly Gly Ala Val Glu Ala Ala Leu Ser Val His Leu Glu

415

420

425

tac ctc gct aca act ctt ggg tca cga gag cag tta gca ata gca gag 1409

Tyr Leu Ala Thr Thr Leu Gly Ser Arg Glu Gln Leu Ala Ile Ala Glu

430

435

440

ttt gca gaa tcc ttg ttg att ata cca aag gtt ctt gct gtc aat gct 1457

Phe Ala Glu Ser Leu Leu Ile Ile Pro Lys Val Leu Ala Val Asn Ala

445

450

455

gcc aaa gat gcc act gaa tta gct gca aaa ctc cgg gct tac cac cat 1505

Ala Lys Asp Ala Thr Glu Leu Ala Ala Lys Leu Arg Ala Tyr His His

460

465

470

475

aca gca caa aca aag gct gat aag aaa cat tta tca agc atg gga cta 1553

Thr Ala Gln Thr Lys Ala Asp Lys Lys His Leu Ser Ser Met Gly Leu

480

485

490

gac ctt tca aag ggg acc atc cga aac aac tta gaa gct gga gtc att 1601

Asp Leu Ser Lys Gly Thr Ile Arg Asn Asn Leu Glu Ala Gly Val Ile

495

500

505

gaa cct gca atg agc aaa ata aag ata att cag ttt gct act gaa gca 1649

Glu Pro Ala Met Ser Lys Ile Lys Ile Ile Gln Phe Ala Thr Glu Ala

510

515

520

gcc ata aca att ctt cga att gat gac atg atc aag ctt gtc aag gat 1697

Ala Ile Thr Ile Leu Arg Ile Asp Asp Met Ile Lys Leu Val Lys Asp

525

530

535

gag act cag aat gaa gag gaa tagatgcaga ctcttgtaag ctgcctccct 1748

Glu Thr Gln Asn Glu Glu Glu

540

545

tttgttttca aatttgtgtc ccttgcgagc tggaggaaag ggggggtgtt tatgtggtgt 1808

tttcagtggg ttttaatttt caaggagctc gcggcctgtg tacttttaggt tagagtccat 1868

ccaaggggtg tttattggat aatgcctaag ctgtttctcg tctattagta ggctggtagt 1928

tccactgagt tctcatccca attaaaagaa tgagatcaaa gggtcctaaa ttcgtactca 1988

ttggtgcacg atttgtttct gacaagcata agacttgacc ctctctatca caataaaaaa 2048

aaaaaaaaaa aa

2060

<210> 10

<211> 588

<212> DNA

<213> Bruguiera sexangula

<220>

<221> CDS

<222> (26)..(262)

<400> 10

gaaaaacaaa gcaatctcct gaagg atg tct tgc tgt ggt gga aac tgt ggc 52

Met Ser Cys Cys Gly Gly Asn Cys Gly

1

5

tgc gga gca agc tgc aat tgc ggc aac ggc tgt gga ggg tgc aag atg 100

Cys Gly Ala Ser Cys Asn Cys Gly Asn Gly Cys Gly Gly Cys Lys Met

10

15

20

25

tac cca gac atg ggc ttc gcc gag aag acc act acc gag act ctg gtt 148

Tyr Pro Asp Met Gly Phe Ala Glu Lys Thr Thr Thr Glu Thr Leu Val

30

35

40

ctc ggc gtg ggg cct gag agg gcc cac ttt gag gga gcc gag atg ggc 196

Leu Gly Val Gly Pro Glu Arg Ala His Phe Glu Gly Ala Glu Met Gly

45

50

55

gtg ccg gcc gag aac gga ggc tgc aag tgc gga agt aac tgc acc tgc 244

Val Pro Ala Glu Asn Gly Gly Cys Lys Cys Gly Ser Asn Cys Thr Cys

60

65

70

gac ccc tgc act tgt aaa tgaggggaaa gtgacagga aggtccgatc 292

Asp Pro Cys Thr Cys Lys

75

tattattagt ctatatgtgt gtgttgggag tcttgcttac aataaaccag tcatgccttg 352

cgtttcctcc atgcgcagat cttaggtttt aggatatctc tgttggtttct ccaagctatg 412

gattttcagt gtctagtttt cctgtattac aaggatagtt tataaccgta tatgcatggt 472

cggaatcctt ccaaccattt cgtttgtcta aatatatata tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt 532

tgatgggaaa gtgagcttct ttatgtttta tgactaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 588

<210> 11

<211> 1280

<212> DNA

<213> Bruguiera sexangula

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1002)

<400> 11

att gaa ggg gaa gtg gtg gaa gtc caa att gat cgg ccg gcg gtg acc 48

Ile Glu Gly Glu Val Val Glu Val Gln Ile Asp Arg Pro Ala Val Thr

1

5

10

15

ggc gcc gcg tcc aag acg ggg aaa ttg acg cta aag acg acg gag atg 96

Gly Ala Ala Ser Lys Thr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Thr Thr Glu Met

20

25

30

gag acg gtg tac gat ttg ggg gcg aaa atg ata gag gca ttg ggg aag 144

Glu Thr Val Tyr Asp Leu Gly Ala Lys Met Ile Glu Ala Leu Gly Lys

35

40

45

gaa aag gtg cag agt ggg gat gtt att gca att gac aag gcg tcc ggc 192

Glu Lys Val Gln Ser Gly Asp Val Ile Ala Ile Asp Lys Ala Ser Gly
50 55 60

aaa att aca aag ctt ggg cgt tca ttt tgc cgg tct agg gat tac gat 240
Lys Ile Thr Lys Leu Gly Arg Ser Phe Ser Arg Ser Arg Asp Tyr Asp
65 70 75 80

gcc atg gga cca cag gtg aag ttt gtt cag tgc cct gat ggg gag ctg 288
Ala Met Gly Pro Gln Val Lys Phe Val Gln Cys Pro Asp Gly Glu Leu
85 90 95

cag aag agg aaa gag gtc gtg cat tgt gtc tca ctg cac gag att gat 336
Gln Lys Arg Lys Glu Val Val His Cys Val Ser Leu His Glu Ile Asp
100 105 110

gtt atc aat agc aga aca cag ggg ttt ctt gct ctt ttc acc ggg gat 384
Val Ile Asn Ser Arg Thr Gln Gly Phe Leu Ala Leu Phe Thr Gly Asp
115 120 125

act ggt gaa atc cgt gcg gag gtg agg gaa caa att gac aca aag gtg 432
~~Thr Gly Glu Ile Arg Ala Glu Val Arg Glu Gln Ile Asp Thr Lys Val~~
130 135 140

gct gaa tgg aga gag gaa ggg aaa gca gag att gtg cca ggt gtc ctc 480
Ala Glu Trp Arg Glu Glu Gly Lys Ala Glu Ile Val Pro Gly Val Leu
145 150 155 160

ttt att gat gag gtc cac atg ctt gac att gag tgc ttc tca ttt ctg 528
Phe Ile Asp Glu Val His Met Leu Asp Ile Glu Cys Phe Ser Phe Leu

165

170

175

aat cgt gct ctt gag aat gag atg gcg cca ata tta gtt gtt gct acc 576

Asn Arg Ala Leu Glu Asn Glu Met Ala Pro Ile Leu Val Val Ala Thr

180

185

190

aac aga ggg atc acc aca atc aga ggc aca aat tac aaa tct cct cat 624

Asn Arg Gly Ile Thr Thr Ile Arg Gly Thr Asn Tyr Lys Ser Pro His

195

200

205

ggg att cca ata gat ctc ctt gat cga cta ctc att atc aca act caa 672

Gly Ile Pro Ile Asp Leu Leu Asp Arg Leu Leu Ile Ile Thr Thr Gln

210

215

220

cct tac aca aag gat gaa att cgt aag att ctg gat atc aga tgt cag 720

Pro Tyr Thr Lys Asp Glu Ile Arg Lys Ile Leu Asp Ile Arg Cys Gln

225

230

235

240

gaa gaa gat gtg gag atg gct gaa gag gca aag gct ttg tta aca cat 768

Glu Glu Asp Val Glu Met Ala Glu Glu Ala Lys Ala Leu Leu Thr His

245

250

255

att ggg gca gaa aca tcc ttg aga tat gcc atc cat ctc att act gct 816

Ile Gly Ala Glu Thr Ser Leu Arg Tyr Ala Ile His Leu Ile Thr Ala

260

265

270

gca gca ttg gca tgc cag aag cga aag gga aag ctt gtg gaa act gag 864

Ala Ala Leu Ala Cys Gln Lys Arg Lys Gly Lys Leu Val Glu Thr Glu

275

280

285

gac att agt cga gct tac aat ctg ttt ctt gat gta aag aga tct aca 912
 Asp Ile Ser Arg Ala Tyr Asn Leu Phe Leu Asp Val Lys Arg Ser Thr
 290 295 300

cag tac cta ata gag tat cag aat cag tac atg ttt aat gag gca ccg 960
 Gln Tyr Leu Ile Glu Tyr Gln Asn Gln Tyr Met Phe Asn Glu Ala Pro
 305 310 315 320

gta gga gaa ggg gac gaa gaa ggg gcc aat gcc atg ctt tct 1002
 Val Gly Glu Gly Asp Glu Glu Gly Ala Asn Ala Met Leu Ser
 325 330

tgaaggcca taagctatgg agtctttgtg aaacccttct ccctacttta ttgcgagcac 1062

gagccctgaa atgaagaaca atggtagact tggatccac cttggccctt atgtatgtct 1122

tctggaattg aaaaaagagt ccaagaaatt tgaatttcac gaaattggag aactgaactg 1182

tgcttactaa attgctactt tgcaagtaat gatagggcac tcacgcttga ctggctaagt 1242

atttatgttt ttatcatcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1280

<210> 12

<211> 337

<212> DNA

<213> *Bruguiera sexangula*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(111)

<400> 12

gcc tgt cgg gtg tgt ggg aat ccg cac ggg ttg atc agg aag tac gga 48
Ala Cys Arg Val Cys Gly Asn Pro His Gly Leu Ile Arg Lys Tyr Gly
1 5 10 15

ctc atg tgc tgc aga cag tgc ttc cgt agc aat gcc aag gaa att ggc 96
Leu Met Cys Cys Arg Gln Cys Phe Arg Ser Asn Ala Lys Glu Ile Gly
20 25 30

ttc att aag tac cgc tgaatgatat cgatatggcc cagaatggcc tgtggcgggtg 151
Phe Ile Lys Tyr Arg
35

cgtgttcgat ttcagtagtt cccctctttc ggatgagctt taggacaatg ttctcttttag 211

tttatgtatt gttagaacttg gactgatgtt gaactaacga tattctggaa tcatttgata 271

tttcgagagt ttattatttt gatcatcatc ctcttgcttc tctgcttaaa aaaaaaaaaa 331

aaaaaa

337

<210> 13

<211> 757

<212> DNA

<213> Bruguiera sexangula

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(696)

<400> 13

gag gcc ctg gac atg atc cag gag cca aag agg cca tca gat aag ccc 48

Glu Ala Leu Asp Met Ile Gln Glu Pro Lys Arg Pro Ser Asp Lys Pro

1 5 10 15

ctc cgt ctc cca ctt cag gat gtg tac aag att ggt ggt att ggg aca 96

Leu Arg Leu Pro Leu Gln Asp Val Tyr Lys Ile Gly Gly Ile Gly Thr

20 25 30

gtc cca gtg ggt cgt gtt gaa act ggt gtc ctg aag cct gga atg gtt 144

Val Pro Val Gly Arg Val Glu Thr Gly Val Leu Lys Pro Gly Met Val

35 40 45

gtt act ttt ggt ccc tca gga ctg acc act gaa gtt aag tct gtg gag 192

~~Val Thr Phe Gly Pro Ser Gly Leu Thr Thr Glu Val Lys Ser Val Glu~~

50 55 60

atg cac cat gaa gct ctc caa gag gct ctt ccc gga gac aac gtt ggc 240

Met His His Glu Ala Leu Gln Glu Ala Leu Pro Gly Asp Asn Val Gly

65 70 75 80

ttc aat gtt aag aat gtt tcc gtg aag gat ctt aag cgg ggt tat gtt 288

Phe Asn Val Lys Asn Val Ser Val Lys Asp Leu Lys Arg Gly Tyr Val

85	90	95	
gcc tca aac tcc aag gat gat cct gcc aag gag gca tct agc ttc acc 336			
Ala Ser Asn Ser Lys Asp Asp Pro Ala Lys Glu Ala Ser Ser Phe Thr			
100	105	110	
tcc caa gtt atc atc atg aac cac cct ggt cag att gga aat ggt tat 384			
Ser Gln Val Ile Ile Met Asn His Pro Gly Gln Ile Gly Asn Gly Tyr			
115	120	125	
gcc cct gtt ctg gat tgc cac acc tct cac att gct gtc aag ttt tct 432			
Ala Pro Val Leu Asp Cys His Thr Ser His Ile Ala Val Lys Phe Ser			
130	135	140	
gag-atc-ctc-aca aag att gat agg cga tct ggc aag gag ctt gaa aag 480			
Glu Ile Leu Thr Lys Ile Asp Arg Arg Ser Gly Lys Glu Leu Glu Lys			
145	150	155	160
gag ccc aag ttc ttg aag aat ggt gat gct ggg ttc gtg aag atg att 528			
Glu Pro Lys Phe Leu Lys Asn Gly Asp Ala Gly Phe Val Lys Met Ile			
165	170	175	
ccg acc aag cct atg gtg gtg gaa act ttc tcc gag tat cct ccg ctt 576			
Pro Thr Lys Pro Met Val Val Glu Thr Phe Ser Glu Tyr Pro Pro Leu			
180	185	190	
ggt aga ttt gcc gtc agg gac atg cgc cag act gtt gca gtg gga gtc 624			
Gly Arg Phe Ala Val Arg Asp Met Arg Gln Thr Val Ala Val Gly Val			
195	200	205	

atc aag agt gtc gag aaa aag gaa cct tct gga gct aag gtg act aaa 672
 Ile Lys Ser Val Glu Lys Lys Glu Pro Ser Gly Ala Lys Val Thr Lys
 210 215 220

tct gct gcc aag aag ggt ggc aaa tgaaccgtgc aagtcagagt tgatgtagat 726
 Ser Ala Ala Lys Lys Gly Gly Lys
 225 230

gaaggctatt ggaagaataa agactgggcc c 757

<210> 14

<211> 770

<212> DNA

<213> Bruguiera sexangula

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(769)

<400> 14

c gat gat atg gac gag gcc aca ccc acc ttt gtt tgg ggc acc aat atc 49
 Asp Asp Met Asp Glu Ala Thr Pro Thr Phe Val Trp Gly Thr Asn Ile
 1 5 10 15

agc gtg cag gat gtc aag gcc gct att cag atg ttt ttg aag cac ttc 97
 Ser Val Gln Asp Val Lys Ala Ala Ile Gln Met Phe Leu Lys His Phe
 20 25 30

agg gat agt aat cag agt caa agg aac gag att ttt gaa gaa ggg aag 145

Arg Asp Ser Asn Gln Ser Gln Arg Asn Glu Ile Phe Glu Glu Gly Lys

35

40

45

tac gtg aaa gcg ata cat aag gtt ctt gaa gtt gaa gga gag tcg ctt 193

Tyr Val Lys Ala Ile His Lys Val Leu Glu Val Glu Gly Glu Ser Leu

50

55

60

gat gtt gat gct cgt gat gtg ttt gat tat gat tct gat ttg tat gcc 241

Asp Val Asp Ala Arg Asp Val Phe Asp Tyr Asp Ser Asp Leu Tyr Ala

65

70

75

80

aag atg att cgg tac cca ctt gag gtt ttg gcc att ttc gac att gtt 289

Lys Met Ile Arg Tyr Pro Leu Glu Val Leu Ala Ile Phe Asp Ile Val

85

90

95

ttg atg gat att gtg agt ttg atc aac cct ttg ttt gag aaa cat gta 337

Leu Met Asp Ile Val Ser Leu Ile Asn Pro Leu Phe Glu Lys His Val

100

105

110

caa gtc agg att ttc aat ctt aag acc tcg att aca atg aga aat ctc 385

Gln Val Arg Ile Phe Asn Leu Lys Thr Ser Ile Thr Met Arg Asn Leu

115

120

125

aac cct tct gat atc gaa aag atg gtg tca ttg aag gga atg ata att 433

Asn Pro Ser Asp Ile Glu Lys Met Val Ser Leu Lys Gly Met Ile Ile

130

135

140

cgg tgt agt tcc ata ata ccg gag atc agg gaa gca gta ttt aga tgc 481
 Arg Cys Ser Ser Ile Ile Pro Glu Ile Arg Glu Ala Val Phe Arg Cys
 145 150 155 160

ctt gtt tgt ggc tac ttc tct gat ccc atc gtt gtg gat aga gga cgg 529
 Leu Val Cys Gly Tyr Phe Ser Asp Pro Ile Val Val Asp Arg Gly Arg
 165 170 175

ata agt gaa cct aaa gca tgc ttg aaa gag gaa tgt ctt act aag aac 577
 Ile Ser Glu Pro Lys Ala Cys Leu Lys Glu Glu Cys Leu Thr Lys Asn
 180 185 190

tcc atg aca cta gtt cac aat cgt tgc agg ttt gct gat aag cag att 625
 Ser Met Thr Leu Val His Asn Arg Cys Arg Phe Ala Asp Lys Gln Ile
 195 200 205

gtg agg ctc cag gag aca cct gac gag atc cct gaa gga gga aca cca 673
 Val Arg Leu Gln Glu Thr Pro Asp Glu Ile Pro Glu Gly Gly Thr Pro
 210 215 220

~~cac acg gtg agc tta ttg atg cat gac aag ctg gta gat gct gga aag 721~~
 His Thr Val Ser Leu Leu Met His Asp Lys Leu Val Asp Ala Gly Lys
 225 230 235 240

cca ggt gac agg gtt gag gtc act gga att tat agg gct atg agt gtt a 770
 Pro Gly Asp Arg Val Glu Val Thr Gly Ile Tyr Arg Ala Met Ser Val
 245 250 255

【図面の簡単な説明】

【図 1】

m a n g l を導入された大腸菌 (S O L R) の耐塩性を検出した結果を示す。検出は、コロニー形成を指標に行なった。対照としてベクターのみ (p B l u e s c r i p t S K) を用いた。2つの塩 (N a C l) 濃度で検定を行なった。

【図2】

m a n g l の各種部分配列を導入された大腸菌 (S O L R) の耐塩性を検出した結果を示す。検出は、コロニー形成を指標に行なった。対照としてベクターのみ (p B l u e s c r i p t S K) を用いた。2つの塩 (N a C l) 濃度で検定を行なった。「*」はコード領域および非コード領域を含んだ m a n g l c D N A を指す。

【図3】

m a n g l を導入された酵母の高塩条件下における生育を経時的に計測した結果を示す図である。検出は細胞濃度を指標に行なった。対照としてベクターのみ (p Y E S 2) を用いた。2つの塩 (N a C l) 濃度で検定を行なった。

【図4】

m a n g l を導入されたタバコ培養細胞の高塩条件下における生育を検出した結果を示す図である。検出は湿重量を指標に行なった。対照としてベクターのみ (G U S) を用いた。3つの塩 (N a C l) 濃度で検定を行なった。

【図5】

m a n g l を導入されたタバコ植物体の高塩条件 (150 mM N a C l) 下における生育を検出した結果を示す図である。A, Cは、対照としてベクターのみ (G U S) を導入したタバコ、B, Dは、m a n g l を導入したタバコを示す。

【図6】

m a n g l を導入された大腸菌 (S O L R) の熱ストレス耐性を検討した結果を示す。熱ストレス耐性は40度培養における生育曲線を指標に評価した。対照としてベクターのみ (p B l u e s c r i p t S K) を導入した S O L R を用いた。

【図7】

m a n g 1 を導入された大腸菌 (S O L R) の浸透圧耐性を検討した結果を示す。浸透圧耐性は 8 0 0 m M のソルビトールを含む 2 Y T 寒天培地上における生育を指標に評価した。対照としてベクターのみ (p B l u e s c r i p t S K) を導入した S O L R を用いた。

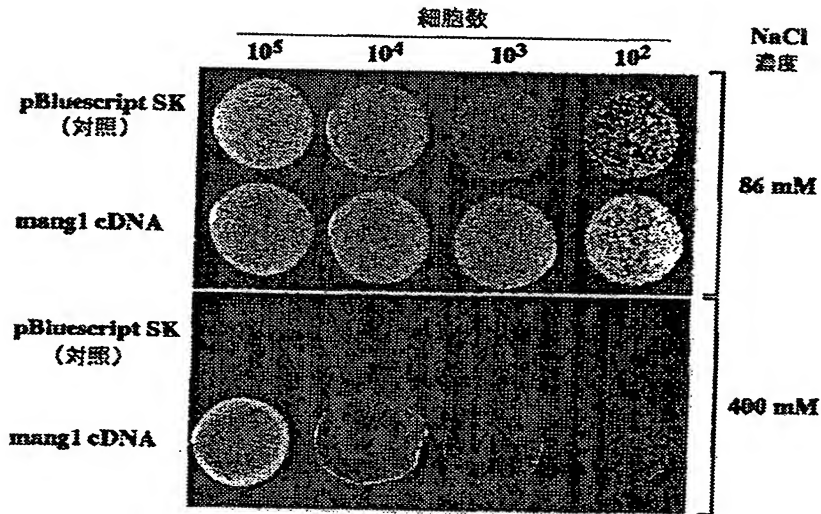
【図 8】

m a n g 1 を導入された大腸菌 (S O L R) の凍結ストレス耐性を検討した結果を示す。凍結ストレス耐性は凍結融解処理を施した菌体の 2 Y T 寒天培地上における生育で評価した。対照としてベクターのみ (p B l u e s c r i p t S K) を導入した S O L R を用いた。

【書類名】 図面

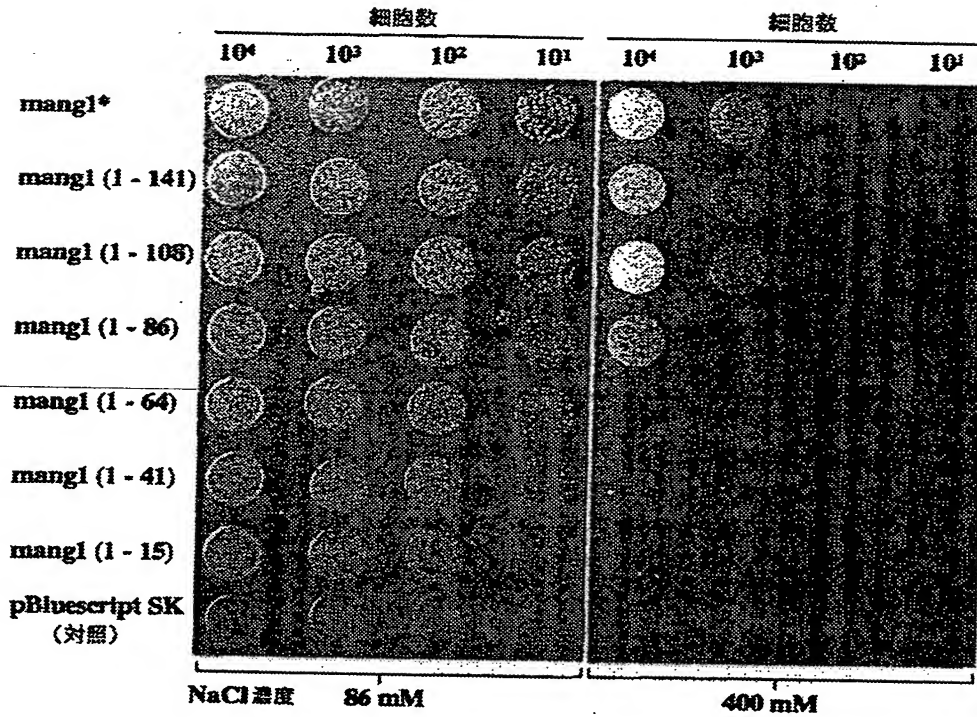
【図 1】

図面代用写真

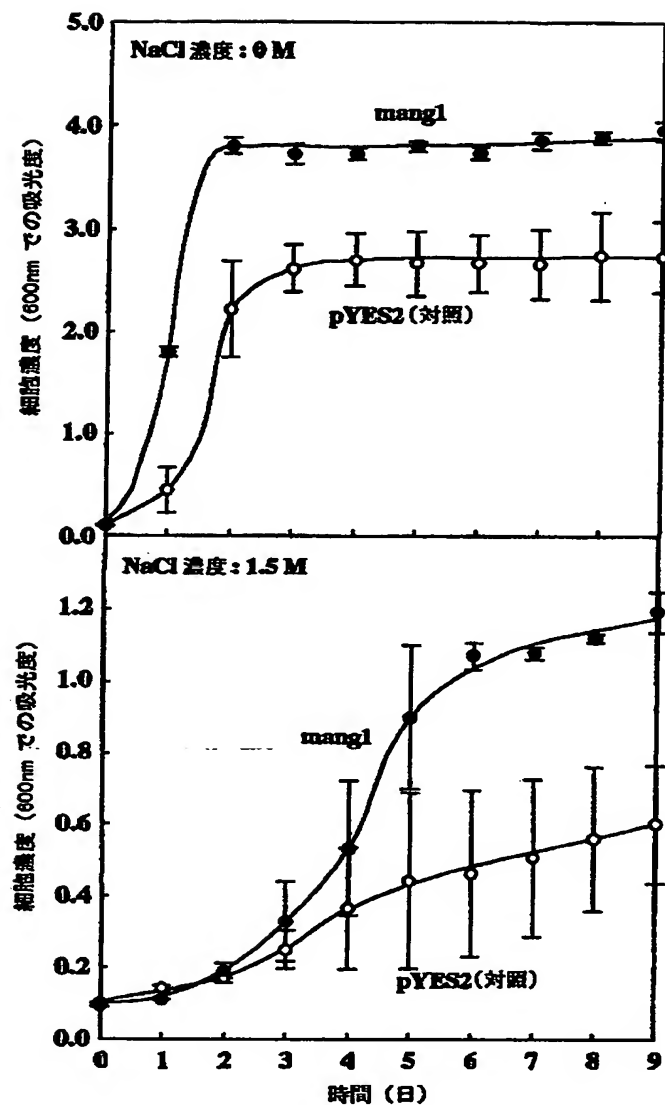


【図 2】

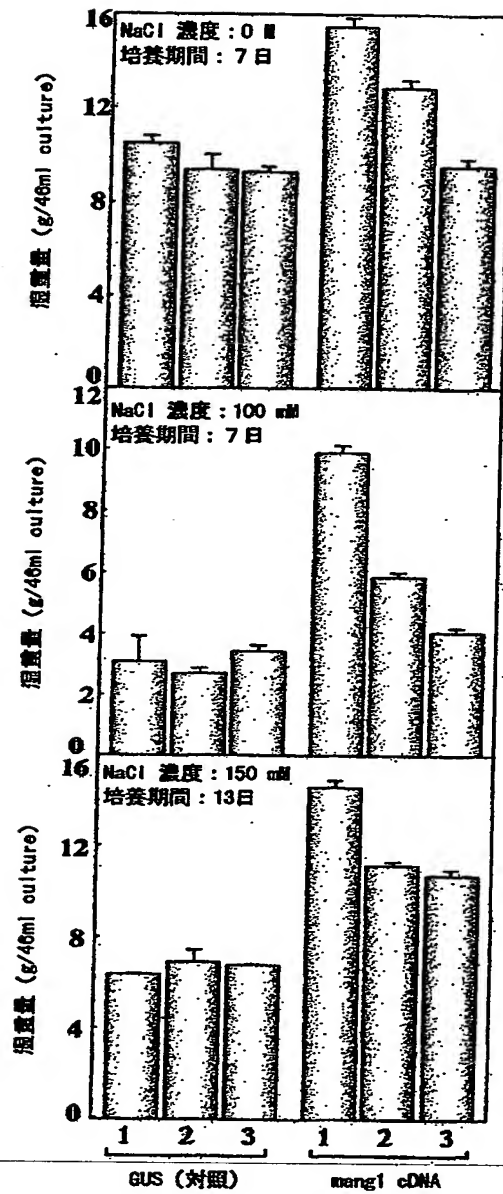
図面代用写真



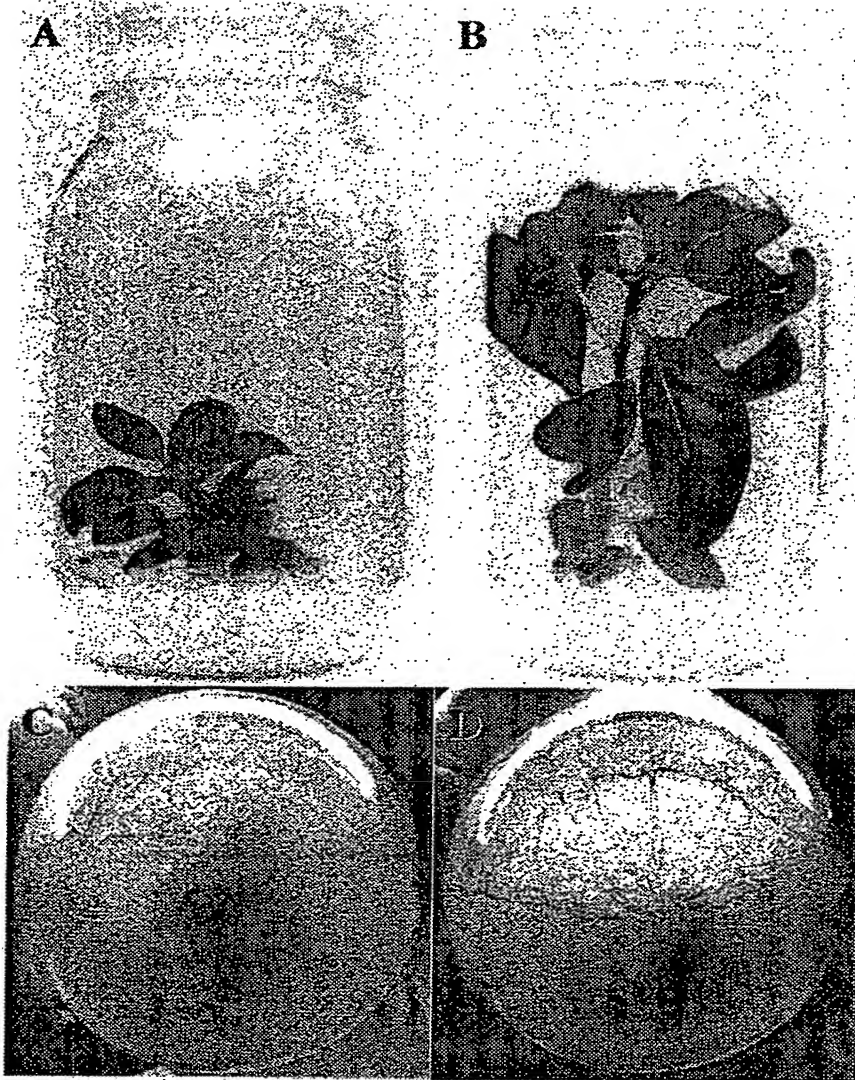
【図 3】



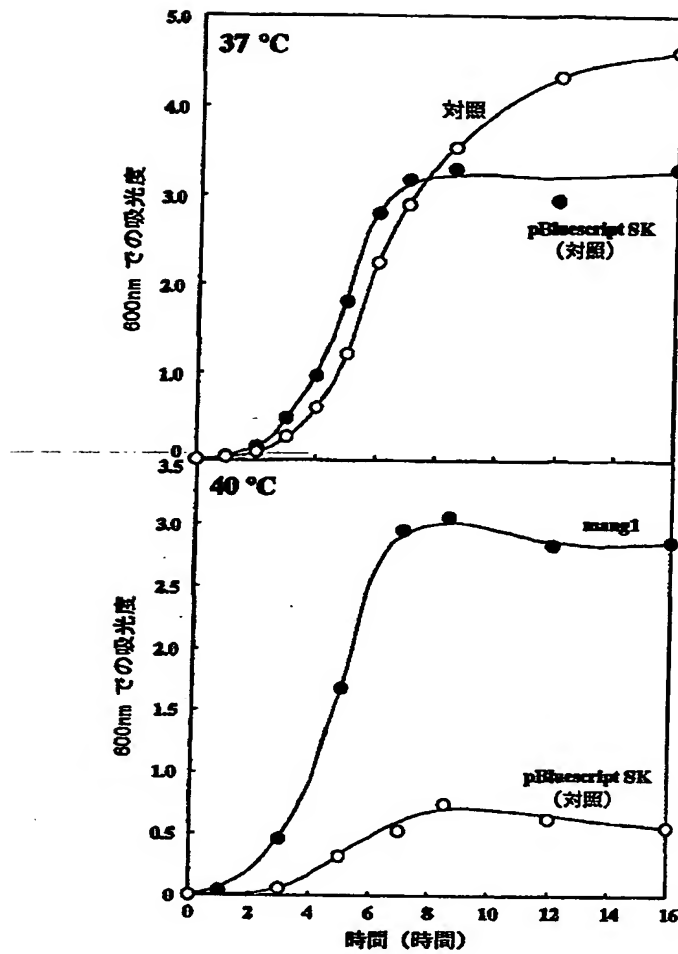
【図4】



【図 5】



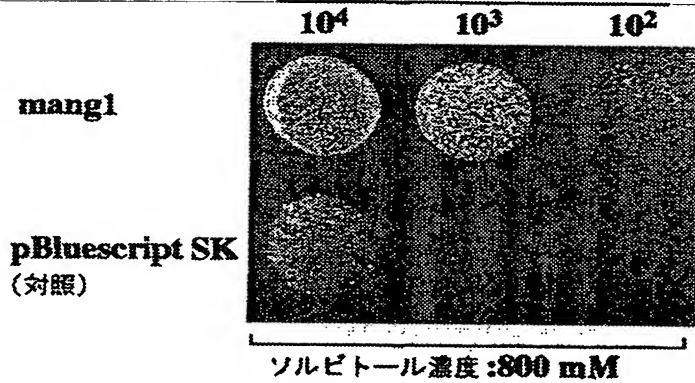
【図 6】



【図 7】

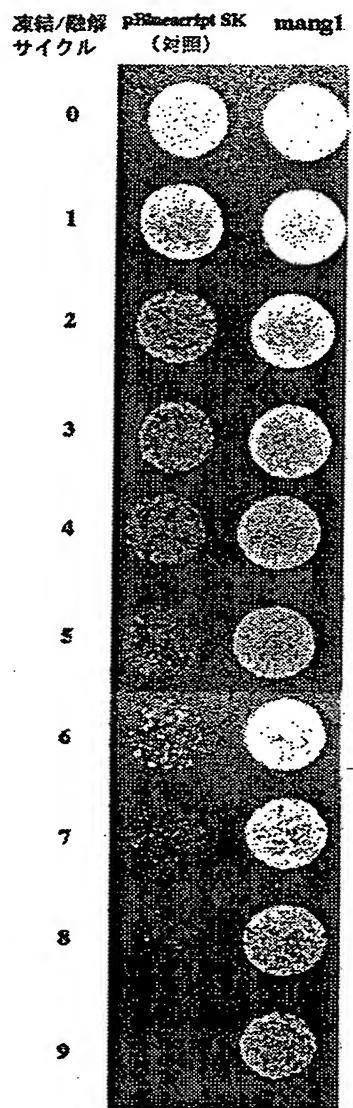
図面代用写真

細胞数



【図 8】

図面代用写真



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 各種生物、特に高等植物の環境ストレスに対する耐性を向上させる。

【解決手段】 ストレス感受性の強い大腸菌にマングローブ等のストレス耐性の強い生物由来の cDNA ライブラリーを発現させ、ストレス耐性が強化されたクローンを選抜する。この方法で得た遺伝子を各種細胞で発現させることで、ストレス耐性が強化された形質転換細胞を作出する。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 平成11年特許願第235910号
【承継人】
【識別番号】 396020800
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【代表者】 川崎 雅弘
【承継人代理人】
【識別番号】 100107984
【弁理士】
【氏名又は名称】 廣田 雅紀
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 044347
【納付金額】 4,200円
【ブルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第235910号
受付番号	50000460780
書類名	出願人名義変更届
担当官	内山 晴美 7545
作成日	平成12年 6月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 4月12日
【承継人】	
【識別番号】	396020800
【住所又は居所】	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
【氏名又は名称】	科学技術振興事業団
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100107984
【住所又は居所】	東京都港区赤坂2丁目8番11号 第11赤坂葵 ビル502 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	廣田 雅紀

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599117842]

1. 変更年月日 1999年 7月19日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都八王子市南陽台2-18-12
氏 名 山田 晃世

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599101760]

1. 変更年月日	1999年 7月21日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都東久留米市大門町2-3-6-302
氏 名	小関 良宏

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

THIS PAGE BLANK (USPTO)